



(12) Wirtschaftspatent

Ertelt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) DD (11) 265 164 A1

4(51) C 12 N 15/00
C 12 N 9/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 306 784 7

(22) 09.09.87

(44) 22.02.89

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22-23, Berlin, 1080, DD
(72) Müller, Andreas, Dr. habil.; Hofmeister, Jürgen, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Herstellung proteinogener Wirkstoffe

(55) Enzym, Pflanzen, Feldbau, Gentechnik

(57) Die Erfindung beinhaltet ein Verfahren zur Herstellung proteinogener Wirkstoffe. Die Erfindung betrifft ein Verfahren, mit dem vor allem Enzyme in großem Umfang und ohne großen Aufwand hergestellt werden können. Anstelle von Mikroorganismen werden dabei als gentechnisch manipulierte Organismen einfach höhere Pflanzen verwendet, die im Feldbau vermehrbar sind. Dazu wird eine für das entsprechende Enzym kodierende DNS-Sequenz mit entsprechenden Promotoren gekoppelt und das so gebildete Gen in das Erbgut der Pflanzen integriert. Aus den regenerierten, vermehrten, angebauten und geernteten Pflanzen wird das Enzym gewonnen, wobei alle die Proteine, die die Anwendung des Enzyms nicht stören, nicht entfernt werden müssen. Die Erfindung ist vor allem zur Herstellung von Chymosin geeignet.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

BEST AVAILABLE COPY

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung proteinogener Wirkstoffe unter Verwendung gentechnisch manipulierter Organismen, **dadurch gekennzeichnet**, daß
 - eine klonierte DNS-Sequenz, die für einen proteinogenen Wirkstoff kodiert, mit solchen Kontroll-Sequenzen gekoppelt wird, die ihre Expression in höheren Pflanzen gewährleisten,
 - das so gebildete chimäre Gen in das Erbgut von Pflanzenzellen integriert wird,
 - aus den transformierten Pflanzenzellen ganze Pflanzen regeneriert und diese vermehrt werden und
 - die proteinogenen Wirkstoffe aus den geernteten Pflanzen gewonnen werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die DNS-Sequenz für ein industriell oder pharmazeutisch nutzbares Enzym kodiert.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die DNS-Sequenz für eine Protease kodiert.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die DNS-Sequenz für kälberspezifisches Prä-Prochymosin oder Prochymosin kodiert.
5. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die DNS-Sequenz für einen nichtenzymatischen Wirkstoff kodiert.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung proteinogener Wirkstoffe unter Verwendung gentechnisch manipulierter Organismen.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Zur Produktion von industriell oder medizinisch nutzbaren Enzymen und anderen proteinogenen Wirkstoffen (z. B. Hormonen) werden in zunehmendem Maße gentechnisch manipulierte Mikroorganismen eingesetzt. Solche biotechnologischen Produktionsverfahren sind insbesondere dann von großer wirtschaftlicher Bedeutung, wenn die Organismen, in denen der betreffende Wirkstoff natürlicherweise vorkommt, nur in begrenztem Umfang verfügbar oder für die Gewinnung des Wirkstoffes wenig geeignet sind. Beispielsweise wird das als Milchgerinnungsenzym für die Käseindustrie unentbehrliche Chymosin traditionell aus dem Labmagen geschlachteter Kälber isoliert und steht daher nur in begrenzter Menge zur Verfügung. Durch die Übertragung einer für Chymosin (bzw. Prochymosin) kodierenden DNS-Sequenz in geeignete Mikroorganismen (Bakterien, Hefe, Pilze) ist es nunmehr möglich geworden, Chymosin auch biotechnologisch zu erzeugen, wie das unter anderem in der PCT-Patentanmeldung 8500 382 beziehungsweise in den EP-Patentanmeldungen 133 756 und 154 351 vorgeschlagen worden ist. Die gentechnisch manipulierten Mikroorganismen werden in Fermentoren kultiviert und schüden das Prochymosin in die Kulturflüssigkeit aus, die danach zum Fertigprodukt des Enzympräparates aufgearbeitet wird. Die Fermentortechnik ist aber relativ teuer; hinzu kommt außerdem, daß die zur Fermentation benötigten Nährmedien in der Regel nicht mit billigen Abfallprodukten (z. B. Melasse) bereitet werden können, sondern Kohlenhydrat- und Proteinquellen nutzen, die auch für die menschliche Ernährung geeignet sind und dieser damit verlorengehen. Prinzipiell die gleichen Charakteristika weisen auch die zur gentechnisch manipulierten Biosynthese anderer proteinogener Wirkstoffe vorgeschlagenen Verfahren auf. Alle bisher bekannten derartigen Verfahren nutzen Mikroorganismen und erfordern dementsprechend relativ teure Fermentoren und Nährmedien.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, über den Spezialfall des Chymosins hinaus Enzyme oder andere proteinogene Wirkstoffe, vor allem solche, die in großen Mengen benötigt werden, in einem einfach zu handhabenden und wirtschaftlich günstigen Verfahren bereitzustellen, wobei im allgemeinen an deren Reinheit nur Anforderungen gestellt werden, wie sie für ihre großtechnische Verwendung unabdingbar sind.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Demzufolge hat sich die Erfindung die Aufgabe gestellt, proteinogene Wirkstoffe mit Hilfe gentechnischer veränderter Organismen zu gewinnen, ohne daß Fermentoren und teure Nährmedien eingesetzt werden müßten. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß eine klonierte DNS-Sequenz, die für einen proteinogenen Wirkstoff kodiert, mit solchen Kontroll-Sequenzen gekoppelt wird, die ihre Expression in höheren Pflanzen gewährleisten, daß das so gebildete chimäre Gen in das Erbgut von Pflanzenzellen integriert wird, daß aus den transformierten Pflanzenzellen ganze Pflanzen regeneriert und diese vermehrt werden und daß die Wirkstoff-Präparate aus den geernteten Pflanzen gewonnen werden. Es ist vorteilhaft, wenn die DNS-Sequenz für ein industriell oder pharmazeutisch genutztes Enzym kodiert, beispielsweise eine Protease. Besonders angepaßt ist die Erfindung an die Fälle, bei denen die DNS-Sequenz für kälberspezifisches Prä-Prochymosin oder Prochymosin kodiert. Es ist aber auch möglich, daß die DNS-Sequenz für einen nichtenzymatischen Wirkstoff kodiert.

Durch die Erfindung werden die Nachteile der bisher bekannten und verwendeten Herstellungsverfahren weitgehend vermieden. Der Anbau gentechnisch manipulierter Pflanzen wie beispielsweise von Tabak kann mit konventionellen landwirtschaftlichen Techniken erfolgen und erfordert keine teuren Nährmedien. Als Energiequelle für die biologische Synthese wird direkt das Sonnenlicht genutzt.

Die erfindungsgemäßen Verfahrensschritte können naturgemäß in vielfältiger Weise variiert werden, ohne daß der Bereich der Erfindung verlassen werden müßte, wie nachfolgend ausführlich beschrieben wird.

Es ist es für die Erfindung gleichgültig, auf welchem Wege die für den gewünschten Wirkstoff kodierende DNS-Sequenz isoliert und identifiziert wird. Es können sowohl natürliche DNS-Sequenzen aus anderen Organismen als auch gentechnisch veränderte oder synthetische DNS-Sequenzen benutzt werden. Es ist auch nicht ausgeschlossen, daß es sich um eine pflanzliche DNS-Sequenz handelt, von der zur Erhöhung der Produktausbeute zusätzliche Kopien in das Genom der Pflanze integriert werden. Im speziellen Fall wird mit einem für Prochymosin kodierenden cDNS-Klon gearbeitet, der aus der RNS des Kälbermagens gewonnen wurde.

Um die kodierende DNS-Sequenz in Pflanzenzellen exprimierbar zu machen, wird sie mit einem pflanzlichen Promotor, einer pflanzlichen Polyadenylierungssequenz und gegebenenfalls zusätzlichen, die Expression steigernden Kontrollsequenzen gekoppelt. Der Promotor kann dabei konstitutiv oder regulierbar sein. Gut geeignet ist beispielsweise der Promotor des TR2'-Gens aus dem Ti-Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens*. Dieser Promotor, der ein hohes konstitutives Expressionsniveau in Tabak und anderen höheren Pflanzen bedingt, liegt in *E. coli*-Plasmiden kloniert vor und ist bereits dazu benutzt worden, bakterielle Gene in höheren Pflanzen zu exprimieren/1, 2/.

Bisher sind jedoch weder mit dem Promotor des TR2'-Gens noch mit anderen pflanzenspezifischen Promotoren solche chimäre Gene konstruiert worden, die für Prochymosin oder einen anderen industriell nutzbaren Wirkstoff kodieren.

Wesentlich an der Erfindung ist, daß die Biosynthese des gewünschten Wirkstoffes in einer zum Feldanbau geeigneten höheren Pflanze erfolgt, sie ist also nicht auf den besonders günstigen Tabak — *Nicotiana tabacum* — beschränkt.

Auch die Methoden zum Transfer des Gens, zur Regeneration ganzer Pflanzen aus den transformierten Pflanzenzellen und zur Vermehrung der regenerierten Pflanzen sind beliebig. Nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand läßt sich das gewünschte Ergebnis bei vielen dikotylen Pflanzen besonders günstig durch agrobakterienvermittelten Gentransfer erreichen/2, 3, 4/. Dabei ist bedeutsam, daß zur Erhöhung der Produktausbeute auch mehrere Kopien des chimären Gens in das Genom integriert werden können und daß ein erblich stabiler transgenerischer Pflanzenstamm entsteht, der beliebig vermehrt werden kann. Im speziellen Fall wird so verfahren, daß bei einer größeren Anzahl transgenerischer Tabakpflanzen immunologisch und/oder enzymologisch der Gehalt an Prochymosin bestimmt wird. Von den Pflanzen mit dem höchsten Prochymosingehalt werden dann durch Selbstbefruchtung Nachkommen gewonnen, die einer erneuten Selektion auf hohe Prochymosinproduktion unterworfen werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, die Kopienzahl durch Kreuzung zwischen unabhängigen Transformanten oder durch erneuten Gentransfer noch weiter zu erhöhen.

Das Wirkstoffpräparat wird zweckmäßig durch Extraktion — etwa der Tabakblätter — gewonnen. Methoden zur großtechnischen Extraktgewinnung aus vegetativem Pflanzenmaterial sind grundsätzlich bekannt. Es ist aber nicht auszuschließen, daß gelegentlich auf die Extraktion verzichtet und das getrocknete und zerkleinerte Pflanzenmaterial bereits als Enzympräparat genutzt werden kann.

Angesichts der Tatsache, daß sich die Erfindung wesentlich auf eine Verknüpfung von an sich bekannten und in anderem Zusammenhang bereits verwendeten Verfahrensschritten bezieht, deren fachgemäße Ausführung im einzelnen keiner weiteren Erläuterung bedarf, kann auf die Darlegung eines Ausführungsbeispiels verzichtet werden.

Literatur

- /1/ Veltien, J., Veltien, L., Hain, R., Schell, J., EMBO J. 3 (1984) S. 2723 ff.
- /2/ Vaeck, M., Reynaerts, A., Hoeffte, H., Jansens, S., De Beuckeleer, M., Dean, C., Zabeau, M., Van Montagu, M., Leemans, J., Nature 328 (1987), S. 33 ff.
- /3/ Gheysen, G., Dhaese, P., Van Montagu, M., Schell, J., in „Genetic Flux in Plants“ (eds. Hohn, R., Dennis, E. S.), S. 11–17, New York 1985
- /4/ Müller, A. J., Mandel, R. R., Schlemann, J., Simoons, C., Inze, D., Mol. Gen. Genet. 207 (1987), S. 171 ff.

BEST AVAILABLE COPY